**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Определение однородности ОФС**

**лекарственных препаратов**

**из сыворотки крови человека**

**и животных методом**

**электрофореза на плёнках** Вводится взамен

**из ацетата** **целлюлозы**

 изложенного в ФС 42-3874-99

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы, который предназначен для определения однородности (идентичности) иммунобиологических лекарственных препаратов (иммуноглобулинов). Метод основан на различной скорости перемещения белков в электрическом поле в зависимости от соотношения основных и кислотных групп белка, рН, ионной силы буферного раствора, величины заряда и молекулярной массы частиц.

Белки движутся в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, движутся к аноду (+), а положительно заряженные – к катоду (–). По скорости движения в электрическом поле белки делятся на 5 основных фракций: альбумины, α1-глобулины, α2-глобулины, β-глобулины и γ-глобулины. Наименьшей скоростью продвижения обладают γ – глобулины (молекулярная масса 150-160 тыс. кДа); они практически остаются на линии старта, т.к. их заряд близок к нейтральному. Альбумины обладают выраженным отрицательным зарядом и меньшей молекулярной массой (67-70 тыс. кДа), поэтому в электрическом поле они движутся с наибольшей скоростью и в результате обнаруживаются дальше других белковых фракций от линии старта. С меньшей скоростью, чем альбумины, в электрическом поле перемещаются α1-, α2- и β-глобулины.

**Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы**

На увлажнённую плёнку из ацетата целлюлозы размером 90х90 мм, заправленную в специальную рамку, наносят 2-4 мкл исследуемых образцов (5 образцов в 2-х параллельных определениях) и для идентификации контрольный образец – сыворотка для контроля качества электрофоретического разделения белковых фракций. Определение проводят в 2-х параллельных определениях. Предварительно в электродные секции камеры (аппарат для электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы) наливают барбиталовый буферный раствор (рН 8,4). Вместо барбиталового буферного раствора можно использовать любой подходящий коммерческий буферный раствор с указанным значением рН.

Рамку с пленкой из ацетата целлюлозы помещают в разделительную камеру, закрывают крышкой, включают источник питания (сила тока 8-10 мА, напряжение 100-129 В). Разделение проводят в течение 30-40 мин. После проведения электрофореза снимают крышку разделительной камеры, не допуская попадания конденсационной воды на пленку. Рамку с плёнкой извлекают из камеры, избегая контакта с участками, где происходил электрофорез испытуемых образцов. Пленку достают из рамки пинцетом и дают подсохнуть на воздухе. Затем плёнку обрезают с обоих концов (около 2,5 мм), помещают в кювету с 50 мл раствора красителя и выдерживают в течение не более 5 мин (контакт с красителем в течение более длительного времени может деформировать плёнку). Плёнку вынимают из кюветы и после стекания избыточной жидкости помещают на 5 мин поочерёдно в 3 кюветы, со 100 мл отмывочной жидкости (для ускорения процесса отмывки кювету покачивают). После отмывки фон плёнки должен приобрести бледно-голубое окрашивание или стать почти прозрачным. Далее плёнку тщательно промывают водой, помещают между листами фильтровальной бумаги и слегка промокают.

Идентификацию белковых фракций проводят путём сравнения электрофореграммы испытуемых образцов с электрофореграммой контрольной сыворотки для контроля качества электрофоретического разделения белковых фракций. Сыворотка должна разделиться не менее, чем на 5 фракций: альбумин, α1- и α2-глобулины, β-глобулин и γ-глобулин. После проведения электрофореза проводят количественное определение фракций иммуноглобулина путём извлечения краски из плёнки элюирующим раствором с последующим колориметрированием или путём денситометрии электрофореграмм.

**Количественное определение фракций иммуноглобулина**

***Колориметрическое определение***. Извлечение краски каждой фракции проводят в 3 мл элюирующего раствора с 2-х параллельных электрофореграмм. Элюцию проводят в течение 40 мин при многократном встряхивании. Оптическую плотность полученного элюата измеряют на спектрофотометре при длине волны 620 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм по отношению к элюату неокрашенного участка электрофореграммы. Сумму оптических плотностей всех белковых фракций принимают за 100% и рассчитывают процентное содержание каждой фракции препарата иммуноглобулина.

***Денситометрическое определение.*** Электрофореграммы исследуемых образцов высушивают между листами фильтровальной бумаги в полиэтиленовом пакете (такие условия высушивания исключают деформацию плёнки). Высушенные плёнки просветляют вазелиновым маслом, пропитывая их таким образом, чтобы в плёнке не остались пузырьки воздуха. Для этого плёнку следует держать горизонтально и нижней поверхностью осторожно касаться масла. Избыток вазелинового масла удаляют, промокая плёнку между листами фильтровальной бумаги.

Фракции иммуноглобулина записываются денситометром в виде пиков. Величина площади каждого пика пропорциональна количеству краски, соединившейся с белком. С помощью автоматического интегратора площадь каждого пика вычисляют по формуле площади прямоугольника (h x d, где h – максимальная высота пика, d – ширина пика). Сумма площадей всех пиков фракций иммуноглобулина принимается за 100% и вычисляется процентное содержание каждой фракции в испытуемом препарате иммуноглобулина.

***Примечания***

1. Подготовка плёнки из ацетата целлюлозы. Плёнку смачивают в барбиталовом буферном растворе и гладкой стороной помещают в кювету на поверхность буферного раствора на 2 мин, а затем пинцетом погружают на дно кюветы и выдерживают 5 мин. После этого плёнку вынимают пинцетом, избыток влаги удаляют между листами фильтровальной бумаги и заправляют в рамку, избегая неравномерного натяжения и провисания.
2. Подготовка испытуемых образцов. Испытуемые образцы предварительно обрабатывают 0,05% раствором красителя – бромфенолового синего, используемого для отслеживания продвижения и распределения белковых фракций препарата иммуноглобулина в процессе электрофореза. В пробирку типа Эппендорф помещают 100 мкл испытуемого образца и 10 мкл 0,05% раствора бромфенолового синего и перемешивают. Окрашенные испытуемые образцы в объеме 2-4 мкл помещают в каждую лунку лотка.
3. Приготовление барбиталового буферного раствора (рН 8,4)\*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 8,5 г натрия барбитала, растворяют в 600-700 мл воды очищенной, прибавляют 11 мл 1М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

\*Вместо барбиталового буферного раствора можно использовать любой другой коммерческий буферный раствор с известным значением рН.

4. Приготовление 1М раствора хлористоводородной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 85 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объём раствора до метки и перемешивают.

5. Приготовление красителя. К 0,5 г амидочёрного 10 Б прибавляют 10 мл уксусной кислоты ледяной, 3 г трихлоруксусной кислоты и 90 мл этилового спирта и перемешивают. Для полного растворения краситель оставляют на 24 ч. Перед использованием раствор красителя перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

6. Приготовление раствора для отмывки электрофореграмм*.* В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл помещают 40 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 700 мл воды очищенной и перемешивают. Затем объём раствора доводят водой очищенной до метки и вновь перемешивают.

7. Приготовление элюирующего раствора. Смешивают 10 мл 1М раствора натрия гидроксида с 1 мл 1М раствора натрия эдетата (трилон Б).

Если условия проведения анализа и реагенты отличаются от приведенных в этой статье, они должны быть указаны в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации с изложением иной валидированной методики анализа.